

(19)

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication
number:

1020030026046

A

(43)Date of publication of application:
31.03.2003

(21)Application
number:

1020010059027

(71)Applicant:

BIOLAB CO., LTD.

(22)Date of filing:

24.09.2001

(72)Inventor:

**KIM, DAE WON
LEE, HONG SEOK**

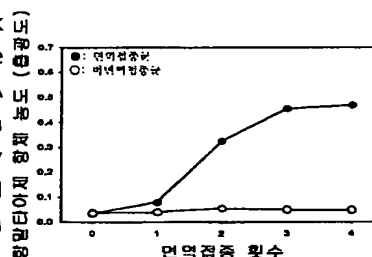
(51)Int. Cl

A61K 39/395

**(54) PRODUCTION OF EGG YOLK ANTIBODY USING SUCRASE AND MALTASE AND
COMPOSITION FOR INHIBITING ABSORPTION OF DIETARY CARBOHYDRATE**

(57) Abstract:

PURPOSE: A process of preparing an egg yolk antibody from egg-laying hens using sucrase and maltase as an antigen is provided. A pharmaceutical, beverage and food composition containing the egg yolk antibody prepared by the process is effective in prevention and improvement of obesity or diseases related with diabetics.



CONSTITUTION: Sucrase and maltase are used as an antigen to immunize egg-laying hens and

then egg yolk antibody is separated from the egg yolk of the egg-laying hens. The sucrase and maltase is separated from the small intestines of a pig, rat, mouse, Guinea pig, rabbit, human or a human-induced cell line, or expressed by a recombinant microorganism or chemically synthesized. A pharmaceutical composition is administered at a daily dose of 5 to 30mg/kg, preferably 10 to 20mg/kg(body weight) through various pathways containing an oral, transdermal, subcutaneous, intravenous or intramuscular pathway.

COPYRIGHT KIPO 2003

Legal Status

Date of final disposal of an application (20040227)

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) . Int. Cl. ⁷
A61K 39/395

(11) 공개번호 특2003-0026046
(43) 공개일자 2003년03월31일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 0059027
(22) 출원일자 2001년09월24일

(71) 출원인 (주)바이오랩
경기도 안양시 동안구 관양1동 1451 - 1 백석빌딩 5층

(72) 발명자 이홍석
서울특별시송파구문정동현대아파트101 - 607
김대원
경기도성남시분당구수내동푸른마을303 - 602

(74) 대리인 위정호
장성구

심사청구 : 있음

(54) 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체의 생산방법 및이를 이용한 식이 탄수화물의 흡수 억제용 조성물

요약

본 발명은 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체의 생산방법 및 이를 이용한 식이 탄수화물의 흡수 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 돼지 소장 유래의 탄수화물 분해 효소인 수크라아제와 말타아제를 분리하는 단계; 상기 수크라아제와 말타아제를 항원으로 사용하여 산란계에 면역시켜 난황항체를 생산하는 단계; 및 상기 산란계가 낳은 달걀의 난황으로부터 난황항체를 분리하는 단계를 포함하는, 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 난황항체를 이용하여 생체 내 탄수화물 분해효소인 수크라아제와 말타아제의 활성을 저해하는 식이 탄수화물의 흡수 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 난황항체는 소장 내에서 탄수화물의 분해를 직접적으로 억제하므로 음식물 섭취의 제한 없이 비만 개선을 위한 다이어트 원료나 당뇨병의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 4

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따라 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 돼지 소장의 막 단백질로부터 수크라아제와 말타아제를 분리한 결과이고,

도 2는 도 1에서 분리된 수크라아제와 말타아제의 온도에 따른 반응 속도의 변화를 나타낸 것이고,

도 3은 도 1에서 분리된 수크라아제와 말타아제의 pH에 따른 반응 속도의 변화를 나타낸 것이고,

도 4는 도 1에서 분리된 수크라아제와 말타아제를 항원으로 면역접종 시 접종 횟수에 따른 산란계의 혈액 중 항 말타아제 항체의 역가를 나타낸 것이고,

도 5는 본 발명에 따라 제조된 난황항체에 의해 돼지 소장 유래 말타아제의 활성이 직접적으로 억제되는 것을 나타낸 것이고,

도 6은 본 발명에 따라 제조된 난황항체에 의해 돼지 소장 유래 수크라아제의 활성이 직접적으로 억제되는 것을 나타낸 것이고,

도 7은 동물모델인 랫트를 이용한 수크로스 과부하 실험 시에 본 발명의 난황항체에 의한 체내 당 농도 증가의 억제를 측정한 결과이고,

도 8은 동물모델인 랫트를 이용한 말토스 과부하 실험 시에 본 발명의 난황항체에 의한 체내 당 농도 증가의 억제를 측정한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체의 생산방법 및 이를 이용한식이 탄수화물의 흡수 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 돼지 소장 유래의 탄수화물 분해 효소인 수크라아제와 말타아제를 분리하는 단계; 상기 수크라아제와 말타아제를 항원으로 사용하여 산란계에 면역시켜 난황항체를 생산하는 단계; 및 상기 산란계가 낳은 달걀의 난황으로부터 난황항체를 분리하는 단계를 포함하는, 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 난황항체를 이용하여 생체 내 탄수화물 분해효소인 수크라아제와 말타아제의 활성을 저해하는식이 탄수화물의 흡수 억제용 조성물에 관한 것이다.

일반적으로 섭취한 음식물의 생체 내 소화는 구강 내에서 탄수화물의 초기 분해를 비롯하여 위장에서 일부 단백질의 분해가 일어난다. 그러나, 본격적인 탄수화물 및 지방의 소화, 흡수는 십이지장에서부터 회장부에 이르는 부위에서 주로 일어나며 일반적으로 대장에서는 주로 수분과 염류 등의 재흡수와 유리지방산의 흡수가 일어나는 것으로 알려져 있다. 따라서, 소화 흡수의 가장 중요한 부분이 바로 소장에서 일어나는데 이때 회장에서 분비되는 트립시노겐, 키모트립시노겐, 카르복시 펩티다아제 등의 단백질 분해 효소, 회장 리파아제, 스텍신 등의 지질 분해 효소, 회장 아밀라아제, 아밀롭

신, 말타아제 등의 탄수화물 분해 효소 및 소장액에 존재하는 다양한 펩티다아제, 핵산 분해효소, 알기나아제, 포스파타제, 각종 당질 분해효소인 유당 분해 효소 등 여러 가지 소화 효소에 의해서 식피가 분해되고 소장 표면에 있는 용모세포에서 흡수되어 암죽관과 혈관을 통해서 흡수된 영양분이 체내로 이동하게 된다.

이러한 용모세포에서의 탄수화물 및 지방 흡수에 가장 중요한 역할을 하는 것이 바로 용모세포 막수송체이다. 용모세포 막수송체는 소장 용모세포의 표면에 존재하는 막수송체 (membrane vesicle)이며 상기 수송체는 SGLT1 (sodium dependent glucose cotransporter 1)이라고 하는 Na 양이온에 의한 단당류의 수송에 매우 중요한 역할을 한다. 즉, 막수송체는 탄수화물의 분해에 의해서 생긴 단당류 중 가장 대표적인 단당류의 체내 능동 수송에 매우 중요한 역할을 담당한다. 또한, 이러한 단당류의 수송에 필수 불가결한 중요한 이당류 분해효소인 수크라아제와 말타아제 및 글루코아밀라아제의 활성이 용모세포 막수송체에서 매우 높게 나타나는데 이러한 효소에 의해서 단당류의 체내 흡수가 증대되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 장관내의 이당류 분해효소에 의한 가수분해는 회장 상부에 이르는 동안에는 별로 이루어지지 않는데, 이것은 이른바 용모세포 막수송체가 가지는 탄수화물 분해효소가 작용하는 막소화에 의존하는 바가 크다는 것을 의미한다. 실제로, 수크라아제와 말타아제의 활성이 많이 발견되는 회장부에 이르기 전까지는 단당류의 흡수가 전체 단당류 흡수량에 비해 상대적으로 낮다는 것이 이를 증명한다고 할 수 있다.

따라서, 탄수화물의 섭취량이 가장 많은 한국인의 식생활 패턴을 고려한다면, 전체 영양소의 섭취를 제한하는 기존의 비만 및 당뇨에 사용되는 식이요법이나 식이섬유를 이용한 장 청소효과 및 지방의 소화 흡수 억제제를 주된 기작으로 하는 다이어트 제품은 적합하지 못하므로, 다른 필수적인 무기이온 및 단백질 등의 흡수저해 없이 탄수화물의 흡수만을 저해할 수 있는 한국인에게 적합한 차별화된 방법의 개발이 요구되고 있다.

한편, 80년대 후반에서 90년대 초에 이르러 몇몇 연구자들에 의해 조류 중 쉽게 접할 수 있으며 고도로 항체를 생성할 수 있는 산란계가 낳은 달걀을 이용한 난황항체에 대한 연구가 시작되었으며, 이러한 연구는 대부분 혈중 항체가의 예측목적, 즉 질병의 진단을 목적으로 행하여진 것으로, 질병의 예방 및 치료를 위해서는 단지 닭의 전염성 F 낭병 바이러스 (Infectious bursal disease virus), 닭의 로타바이러스 (Rotavirus) 등의 닭 바이러스를 이용하여 수행되었다.

암탉의 혈청 내의 면역글로블린인 IgG는 후대에 그대로 물려주게 되어 달걀에도 이러한 면역글로블린이 생기게 되는데, 이와 같이 난황에 생긴 면역글로블린을 난황항체 (IgY, egg yolk IgG)라고 하며 이러한 원리를 이용하여 수동면역의 개념으로서 항원에 특이적인 항체를 대량으로 생산, 이를 이용하는 기술이 많이 연구되고 있다. 일단 암탉이 특정 항원에 대한 항체를 생성하는 것을 '습득'하게 되면, 닭의 일생 동안, 즉 10년에 걸쳐서 항체를 생성할 수 있다. 나아가, 달걀은 평균적으로 8 mg/ml의 IgG를 가지는 15ml의 난황을 함유한다. 닭 이외에도, 기타 가금류, 예컨대 칠면조, 오리, 거위 등을 알의 공급원으로서 사용할 수 있다.

알을 낳는 닭은 닭에서 발견되는 모든 항체 아이소타입, 즉 IgY, IgM 및 IgA 항체를 알로 전달한다. 난황은 단지 IgY만을 함유하고 IgM 및 IgA는 난백 부분에만 존재하는데, 닭의 혈청 IgY 농도는 항원의 단일 투여 후 (약 1주일 후) 난황에 영향을 준다. 난황은 3~25 mg IgY/ml를 포함하므로 중량에 따라 각 알은 40~500 mg IgY를 제공할 수 있다.

난황 항체의 장점은 다량으로 얻을 수 있으며, 이의 추출은 비용을 많이 투자하지 않고도 대규모로 수행할 수 있어 매우 경제적이다. 또한, 난황항체는 포유류 보체, Fc 수용체, 단백질 A 또는 단백질 G와 반응하지 않아 면역반응을 일으키지 않으며, 산 및 열에 대해 큰 내성을 나타낸다. FDA는 난황항체를 약물이라기보다는 식품으로 간주하여 GRAS (일반적으로 안전한 것으로 허용됨) 상태로 승인하였으며, 난황항체를 AIDS 또는 기타 질병에 걸린 인간에게 사용할 수 있도록 FDA가 승인하였기 때문에 그 안정성에 있어도 매우 우수하다.

이와 같이 난황항체를 이용하여 항원에 특이적인 항체를 대량으로 생산, 이를 이용하는 기술로는 미국의 CalaGen사와 ImmuCell사에 의해 초유에서 분리한 항체 (IgA)를 이용하여 장내 감염 미생물에 의한 질환 치료제가 개발되어 임상 중에 있으며, 현재 국내에서도 위장병의 원인균인 헬리코박터 파이로리를 비롯하여 대장균, 살모넬라, 충치의 주원인균인 스트렙토코커스 뮤탄스 등에 대한 난황항체를 이용하여 식품 첨가제 및 사료 첨가제 등으로 이용되고 있다.

이에 본 발명자들은 탄수화물의 소화 흡수에서 중요한 역할을 하는 효소인 수크라아제와 말타아제를 돼지 소장으로부터 분리하여 이를 항원으로 닭에 면역 접종한 후 생산된 달걀로부터 이에 대한 난황항체를 생산하는 방법을 개발하고 상기 방법에 의해 생산된 난황항체가 생체 내 탄수화물의 소화 흡수를 직접적으로 억제하여 비만 및 당뇨 질환의 개선 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 산란계에서 탄수화물 분해효소에 대한 난황항체를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 난황항체를 포함하는 탄수화물 흡수 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수크라아제와 말타아제를 항원으로 사용하여 산란계에서 난황항체를 생산하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 난황항체를 유효성분으로 함유하는 탄수화물 흡수 억제용 약학 조성물을 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 난황항체를 유효성분으로 함유하는 식품 및 음료 조성물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 수크라아제와 말타아제를 항원으로 사용하여 산란계에서 난황항체를 생산하는 방법을 제공한다.

상기 생산방법은

- 1) 수크라아제와 말타아제 단백질을 항원으로 사용하여 산란계에 면역시키고 이로부터 난황항체를 생산하는 단계; 및
- 2) 상기 산란계가 낳은 달걀의 난황으로부터 난황항체를 분리하는 단계를 포함한다.

이하 상기 단계를 보다 구체적으로 설명한다.

본 발명의 바람직한 실시예로서 단계 1)에서는 돼지 소장으로부터 막단백질을 분리하고 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 수크라아제와 말타아제를 정제한다 (도 1 참조). 정제된 수크라아제와 말타아제의 효소활성을 측정하기 위하여 각 효소활성의 최적 반응온도와 pH를 조사한 결과, 수크라아제는 40℃와 약산성 pH (pH 5 내지 6) 부근에서, 말타아제는 50℃와 중성 pH (pH 6 내지 7) 부근에서 최고의 활성을 나타내었다 (도 2 및 도 3 참조).

본 발명에서 항원 단백질로 사용된 수크라아제와 말타아제는 돼지 소장뿐만 아니라 랫트, 마우스, 기니아피크, 토끼 또는 사람 및 사람 유래 세포주로부터 분리될 수 있으며, 이들 효소 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 미생물에 발현된 것을 분리하여 사용할 수 있고, 화학적으로 합성된 것을 사용할 수도 있다.

상기에서 분리된 수크라아제 및 말타아제 단백질을 항원으로 이용하여 산란계에 면역 접종한 후 이로부터 난황항체를 생산할 수 있다. 이용되는 산란계로는 그 종류가 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면 산란율이 높은 백색 레그혼계, 로드아일랜드계, 하이라인 브라운계 등을 이용하는 것이 바람직하다.

항원 단백질을 산란제에 피하, 복강내, 근육내 또는 정맥내 주사나 경구 투여와 같은 임의의 적절한 경로로 접조하여 면역화시킨다. 바람직한 면역화 방법은 근육내 주사하는 것이며, 목에 피하 주사도 가능하다. 면역화를 증가시키기 위해서 적절한 보조제가 항원과 함께 투여되는 것이 좋은데, 이를 위해 유용한 보조제는 완전 또는 불완전 프로인트 보조제 (incomplete or complete Freund's adjuvant)와 같은 유증수 유화 보조제이다. 적절한 보조제를 사용하면 장기간 동안 면역화된 산란제의 알에서 높은 항체 역가를 유지하는 데 매우 효과적이며, 따라서 소정의 항체 함유 물질을 효과적으로 생성할 수 있다. 항원의 용량은 일반적으로 10 내지 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 범위이나 항원과 보조제의 유형, 면역 상태가 과도한 항원 독성 형성 없이 산란제에서 유도될 수 있는 방식의 투여 경로에 따라 변화될 수 있다.

일반적으로 초기 면역화 (접종) 후 몇 주 내에 산란제는 항원에 대한 감응성이 생긴다. 즉, 항원에 대해 면역화된다. 항원에 대한 특이 항체는 산란제의 몸에서 생성되며, 산란제가 낳은 알은 특이 항체를 포함하고 있다. 산란제와 알에서 항원에 대한 특정 항체의 존재 및 역가 농도는 당업계에 공지된 각종 면역학 시험으로 확인할 수 있는데, 본 발명에서는 바람직한 실시예로서 효소면역 측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 등을 사용하여 난황과 혈청의 항체 활성을 측정한다.

항원에 대한 초기 면역화 이후, 적절한 용량의 1회 이상의 추가 항원을 투여하여 산란제에서 높은 항체 역가를 유지할 수 있다. 각각의 추가 항원 투여에서, 적절한 보조제는 항원과 함께 사용될 수 있다. 초기 면역화와 1차 추가 항원 투여 사이의 간격과, 개별 추가 항원 투여 사이의 간격은 항원의 특성에 좌우되며, 2주 이상인 것이 좋다.

소정의 특이 항체의 적절한 역가가 면역화된 산란제가 낳은 알에 존재하는 것을 확인한 후에, 산란제가 낳은 알을 모으고 필요에 따라 사용 전까지 저장한다. 동일한 항체에 대해 면역화한 1종 이상의 산란제가 낳은 여러 개의 알을 모으고 함께 처리하여 항체를 포함하는 소정의 물질을 생성하는 것이 편리하다.

단계 2)는 산란제가 낳은 달걀의 난황으로부터 난황항체를 분리하는 단계로서, 달걀의 난황은 고농도의 지방분을 포함하고 있어 난황항체의 작용을 용이하게 하기 위해서는 고효율로 순수 분리하는 것이 필요하며, 특히 생체에 유해하지 않아야 한다. 이를 위하여, 산란제에서 회수한 달걀로부터 난황항체를 정제하기 위한 추출 재료로 λ -카라기난과 다당류 및 증류수 또는 카프릴산 (caprylic acid)을 이용한 추출 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 분리한 난황을 증류수로 희석시킨 용액에 카라기난 용액을 첨가한 후 원심분리하여 난황 리포 단백질을 침전시킨 후 이로부터 얻은 상등액을 염출하여 난황 수용성 단백질만을 분리한다. 특히, 카라기난 용액은 식품첨가물로서 공인된 검 용액으로 생체안정성과 항체 회수율이 우수하고 회수한 항체의 역가를 높게 유지할 수 있다.

이와 같이 분리·정제된 난황항체는 말타아제와 수크라아제의 효소활성을 효과적으로 억제하며 (도 4 및 도 5 참조), 생체 내 적용 시 상기 효소활성 억제를 통해 탄수화물의 흡수를 효과적으로 저해함으로써 혈당량을 감소시킴을 확인하였다 (도 6 및 도 7 참조).

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 난황항체를 유효성분으로 함유하는 탄수화물 흡수 억제용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명에 따라 생산된 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체는 생체 내에서 탄수화물의 분해를 직접적으로 억제하여 혈당량을 감소시키므로 상기 난황항체를 유효성분으로 하는 약학 조성물은 음식물 섭취의 제한 없이 과도한 탄수화물의 흡수에 기인한 질환들, 예를 들어, 비만, 당뇨병, 고혈압 등의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물을 이용하여 통상적인 방법에 따라 약학 제형을 제조할 수 있다. 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이, 엘릭서, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 및 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 포장 분말 등의 형태일 수 있다.

적당한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 검, 알긴산염, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제형은 충전제, 항응집제, 율활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 포유 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화할 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥내 또는 근육내를 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 사람의 경우 난황항체의 통상적인 1일 투여량은 5 내지 30 mg/kg 체중, 바람직하게는 10 내지 20 mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다.

그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 치료할 질환, 선택된 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 증상의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 난황항체를 유효성분으로 함유하는 식품 및 음료 조성물을 제공한다.

본 발명의 식품 및 음료 조성물은 체내에서 탄수화물의 분해를 억제하므로 비만 억제, 혈당량 조절 등을 통하여 건강을 유지 및 향상시킬 수 있다.

본 발명의 난황항체는 또한 비만 개선을 위한 다이어트 원료로서, 또는 과도한 탄수화물의 흡수에 기인한 질환, 예를 들어 당뇨병 등의 예방 및 치료 효과를 나타낼 목적으로 식품 또는 음료에 첨가제 또는 식품 보조제로서 혼입될 수 있다. 상기 식품 또는 음료로는, 육류; 야채 주스 (예를 들어, 당근 주스 및 토마토 주스) 및 과일 주스 (예를 들어, 오렌지 주스, 포도 주스, 파인애플 주스, 사과 주스 및 바나나 주스); 초콜렛; 스낵류; 과자류; 피자; 빵, 케익, 크래커, 쿠키, 비스킷, 누들 등과 같이 곡물 분말로 만들어진 식품류; 견류; 우유, 치즈, 요구르트 및 아이스크림과 같은 유제품; 스프; 육즙; 페이스트, 케첩 및 소스; 차; 알콜성 음료류; 탄산 음료류; 비타민 복합체; 및 다양한 건강 식품류 등이 있다. 이 경우, 식품 또는 음료 중 난황항체의 함량은 0.05 내지 0.5 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 0.2 중량%의 범위일 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1> 수크라아제와 말타아제 난황항체의 제조

(단계 1) 돼지 소장으로부터 수크라아제와 말타아제의 분리

소화 효소에 관여하는 수크라아제와 말타아제의 분리를 위하여 신선한 돼지의 소장을 생리식염이 포함된 인산염 완충액 (sodium phosphate saline buffer, 이하 'PBS'로 약칭함)으로 세척하고 점막층을 긁어낸 후, 200 mM 만니톨을 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 6)에 1:10의 비율로 혼합하였다. 상기 혼합액을 균질화하고 50 mM의 염화칼슘을 첨가하여 방치한 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액을 35,000× g로 초원심분리하여 침전된 막단백질을 분리하였다. 분리된 막단백질을 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8)으로 평형화시킨 DEAE-세파로오스 (DEAE-Sephrose) 컬럼 (아머삼파마시아바이오텍사)에 단백질을 흡착시키고 0 내지 1.0 M 염화나트륨을 포함하는 동일 완충액으로 선택적으로 단백질을 분획하여 수크라아제와 말타아제를 분리하였다 (도 1).

이들 소장 유래 막 단백질들은 당과 결합된 당단백질로 수크라아제 활성과 말타아제 활성을 가지는 소단위 (subunit)로 구성되어 있으며 14 내지 15만 정도의 분자량을 가진다. 또한, 장내 부위에 따라 분자량 26만 정도의 하나의 긴 폴리펩티드 사슬로도 나타난다 (Siostrom, H. et al., J. Biolog. Chem. 255(23), 1980). 상기에서 분리된 수크라아제와 말타아제 단백질 분획을 SDS - PAGE 전기영동으로 분석한 결과, 분자량 20만 이상과 15만 정도의 위치에서 단백질 밴드가 검출됨을 확인하였다.

(단계 2) 분리된 수크라아제와 말타아제의 효소활성 측정

상기 단계 1에서 분리된 효소의 활성을 조사하기 위하여 기질로 수크로스 및 말토스 각각을 첨가하여 효소 반응을 수행하였다. 반응액은 기질 1%, 50 mM 인산염 완충액, 효소 (0.2 munit), 증류수를 포함하며 반응용량은 0.1 ml로 37℃에서 20분간 반응시켰다. 이때, 효소의 최적 반응 온도와 pH의 조사를 위하여 온도는 30℃ 내지 70℃까지의 온도범위에서 반응시켰으며 pH는 3 내지 9까지의 pH 범위에서 반응시켰다. 반응 후 100℃에서 효소활성을 정지시켰으며 생성된 포도당 농도는 포도당 산화효소를 이용한 GOD - POD 비색방법인 지엘자임키트 (신양화학약품사)를 이용하여 정량하였다.

그 결과, 수크라아제는 40℃와 약산성 (pH 5 내지 6) 부근에서 최고의 효소활성을 보였으며 말타아제는 50℃와 중성 (pH 6 내지 7)에서 최고의 활성을 나타내었다(도 2 및 도 3).

(단계 3) 산란계의 면역

상기와 같이 돼지 소장으로부터 분리·정제된 수크라아제와 말타아제를 항원으로 이용하여 보아스 브라운 (Boas brown) 종 산란계 20마리의 다리 근육에 100 µg/kg의 농도로 면역 보조제인 프로인트 불완전 보조제와 함께 3주 간격으로 3회 접종 후 마지막 4회는 면역 보조제 없이 항원만으로 면역 접종을 실시하였다. 달걀은 매일 수집한 후 4℃에서 보관하고, 면역 접종된 산란계에서 주입된 항원에 대한 항체의 형성 여부를 확인하기 위하여 면역 접종 횟수별로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하여 하기와 같이 효소 면역 측정법 (ELISA)을 수행하였다.

효소 면역 측정법을 위한 항원으로 상기 단계 1에서 분리한 수크라아제와 말타아제를 96 웰 마이크로플레이트에 1 내지 100 µg을 분주하여 밤새 코팅한 다음, 비특이적 항체의 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지유 (skim milk)를 처리하였다. 상기 웰 플레이트를 완충액으로 3회 세척하고, 항혈청을 3,000배 희석하여 37℃에서 30 내지 60분간 일차 항체로서 반응시킨 후, 결합하지 않은 항체를 0.02% 트윈 20이 함유된 생리식염 함유 인산염 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 다시 알카라인 포스파타아제가 결합된 항 - 닭 IgG (시그마알드리치)를 1,000배 희석하여 이차 항체로서 실온에서 60분간 결합시켰다. 반응이 종결된 후 상기 플레이트를 0.02% 트윈 20이 함유된 완충액으로 5회 세척하고 알카라인 포스파타아제의 기질인 PNPP (p - nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer, 시그마알드리치) 1 mg/ml을 첨가하여 40분간 반응시킨 후 450 nm에서 ELISA 판독기로 각 웰의 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 2차 접종 이후에 말타아제에 대한 항체가 산란계의 혈청 내에서 생성되기 시작하였으며 3차 접종이후 최고치를 유지하였다(도 4).

(단계 4) 난황항체의 분리

상기에서 수크라아제와 말타아제 항원 단백질에 대한 항체의 형성이 확인된 산란계로부터 회수한 달걀의 난황을 분리한 후 증류수와 1:1의 부피로 혼합하였다. 여기에 λ - 카라기난 (carrageenan, 1 mg/ml in D.W., 시그마알드리치) 용액을 2배로 첨가한 후 실온에서 30분간 방치하였다. 상기 혼합액을 원심분리 (10,000 × g, 15분, 20℃)하여 상등액만

을 취하고 와트만 여과지 (Watman No. 2 filter paper)로 여과한 후 통과된 여액에 19% 황화 나트륨 (sodium sulfate)을 첨가하여 염출을 수행하였다. 이를 다시 원심분리 (10,000× g, 15분, 20℃)하여 침전물만을 회수한 후 PBS에 재현탁시키고 황화 나트륨을 이용하여 염출과 원심분리 (10,000× g, 15분)를 수행하였다. PBS에 재현탁된 시료를 10 mM PBS로 투석한 후 이로부터 얻은 투석액을 동결건조하여 난황항체를 얻었다.

< 실시예 2> 난황항체의 효소활성 억제 확인

상기 실시예 1로부터 분리·정제된 난황항체가 실제로 용모세포 막수송체의 수크라아제와 말타아제의 활성을 억제할 수 있는지의 여부를 확인하기 위해서 상기 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 각각 수크라아제와 말타아제의 효소 활성을 측정하였다. 효소반응 시에 난황항체를 1 mg/ml의 농도로 첨가하여 효소의 활성저해 정도를 측정하였다. 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체의 활성저해를 비교하기 위해 효소를 첨가하지 않은 대조군과 항체 미첨가군, 일반 난황항체 첨가군, 수크라아제와 말타아제에 면역화된 난황항체 첨가군을 이용하였다.

그 결과, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따라 제조된 난황항체에 의해 수크라아제와 말타아제 모두 약 60% 정도의 효소활성이 저해됨을 확인하였다.

< 실시예 3> 생체 내 탄수화물의 흡수 억제 활성

본 발명에 따라 제조된 난황항체가 생체 내 탄수화물의 흡수 억제 활성을 나타내는지 여부를 SD 랫트를 이용하여 조사하였다. 체중 400 g의 10 주령 SD 랫트 (대실험동물)를 각 군당 10마리씩 4군으로 분리하여 12시간 동안 절식시킨 후, 대조군에는 생리식염수만 투여하였고, 실험군에는 본 발명에 따라 제조된 난황항체를 체중 1 kg당 1 mg 또는 5 mg으로 투여하였다. 투여 시 항체를 생리식염이 함유된 인산염 완충액에 분산시킨 주사액을 종대를 이용하여 경구투여하였다. 난황항체 투여 후 10분 경과한 뒤 200 mg/kg의 수크로오스 및 말토스를 각각 경구 투여하였고 시간별로 혈액을 채취하여 혈당량을 정량하였다. 혈액 내 포도당 농도는 포도당 산화효소를 이용한 GOD-POD 비색방법인 지엘자임키트 (신양화학약품)를 이용하여 정량하였다.

그 결과, 난황항체를 투여하지 않은 대조군에서는 혈당량이 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 30분째에 12 mg/dl, 4시간째에 35 mg/dl가 증가하였다. 체중 1 kg당 1 mg 또는 5 mg의 난황항체가 투여된 실험군에서는 혈당량이 30분째에 각각 5 mg/dl와 4 mg/dl의 증가량을 보여 대조군에 대하여 각각 58% 및 67%의 혈당 흡수 억제 효과를 보였으며, 4시간째에는 22 mg/dl 및 13 mg/dl의 혈당 증가량을 보여 대조군에 대비하여 37% 및 65%의 억제 효과를 보였다(도 7).

말토스의 경우에는, 대조군에서는 혈당량이 30분째에 10.6 mg/dl, 4시간째에 23.9 mg/dl로 증가한 반면, 난황항체가 각각 체중 1 kg당 1 mg 또는 5 mg 농도로 투여된 실험군에서는 혈당량이 각각 30분째에 9.6 mg/dl 및 7.8 mg/dl의 증가량을 보여 대조군에 대비하여 9% 및 26%의 혈당량 증가 억제 효과를 보였다. 4시간째에 도 혈당 증가량은 19.3 mg/dl 및 12.4 mg/dl로 대조군 대비 19%와 48%의 억제 효과를 보였다(도 8).

이로부터 본 발명에 따라 제조된 난황항체가 농도 의존적 양상으로 생체 내 당 흡수를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

< 제제예 1> 약학적 제제의 제조

다음의 성분들을 혼합하여 경질 젤라틴 캡셀에 충전함으로써 캡셀제를 제조하였다:

양 (mg/캡셀)

활성 성분 (실시예 1의 난황항체) 20

건조 전분 160

마그네슘 스테아레이트 20

총 200 mg

< 제제에 2> 난황항체를 포함하는 기능성 식품의 제조

본 발명의 난황항체를 포함하는 기능성 식품들을 하기와 같이 제조하였다.

(1) 유제품 (dairy products)의 제조

난황항체를 우유에 5 중량%의 양으로 첨가하고 이 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

(2) 혼합 음료의 제조

난황항체 1 g을 토마토, 당근, 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 혼합 음료를 수득하였다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따라 산란계로부터 생산된 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체는 산란계를 이용하여 안전하게 대량으로 생산이 가능하여 매우 경제적인 뿐만 아니라 다른 필수적인 무기이온 및 단백질 등의 흡수 저해 없이 탄수화물의 흡수만을 효과적으로 저해함으로써 비만 및 당뇨 질환의 개선 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- 1) 수크라아제와 말타아제 단백질을 항원으로 사용하여 산란계에 면역시키고 이로부터 난황항체를 생산하는 단계; 및
- 2) 상기 산란계가 낳은 달걀의 난황으로부터 난황항체를 분리하는 단계를 포함하는, 수크라아제와 말타아제에 대한 난황항체를 생산하는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 수크라아제와 말타아제 단백질이 돼지, 랫트, 마우스, 기니아픽, 토끼 또는 사람의 소장 또는 사람 유래 세포주로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 수크라아제와 말타아제 단백질이 재조합 미생물에 의해서 발현된 것이거나 화학적으로 합성된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 단계 1에서 10 내지 200 $\mu\text{g/kg}$ 체중의 항원 용량으로 1회 이상 주사하여 산란계를 면역시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 난황항체를 유효성분으로 함유하는, 탄수화물 흡수 억제용 약학 조성물.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 비만 또는 당뇨병 관련 질환의 예방 및 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

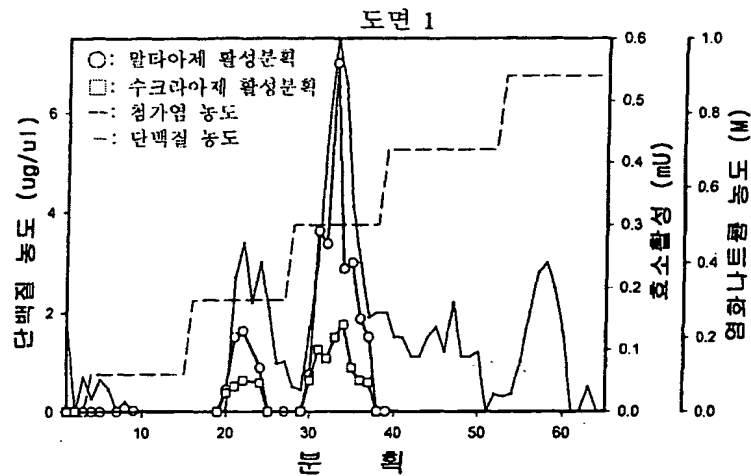
청구항 7.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 난황항체를 유효성분으로 하는 식품 및 음료 조성물.

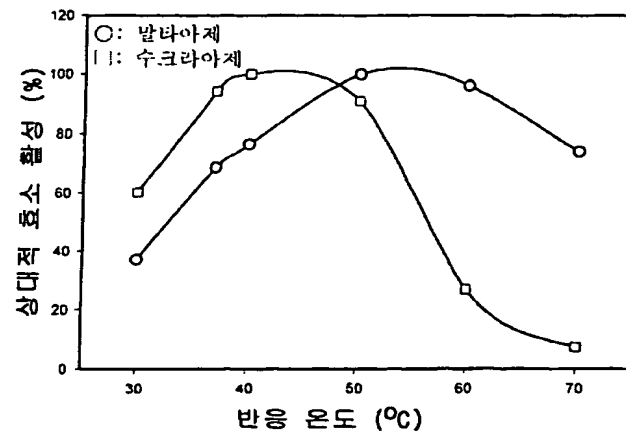
청구항 8.

제 7항에 있어서, 비만 방지 또는 개선에 사용되는 것을 특징으로 하는 식품 및 음료 조성물.

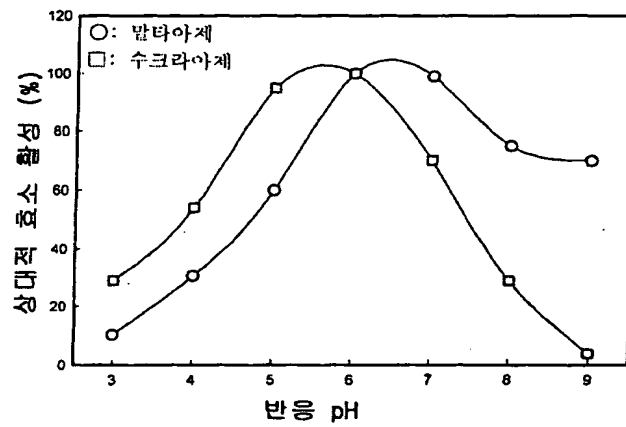
도면



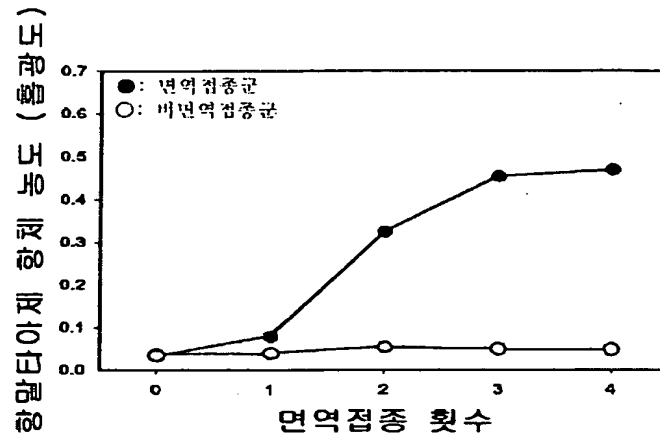
도면 2



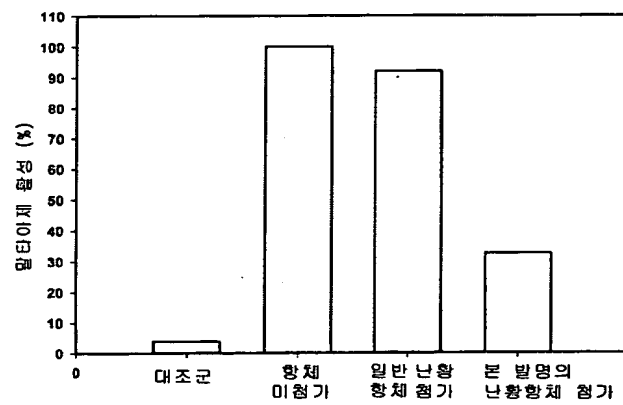
도면 3



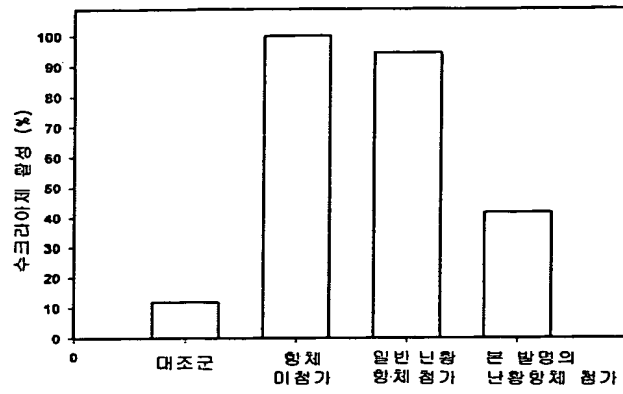
도면 4



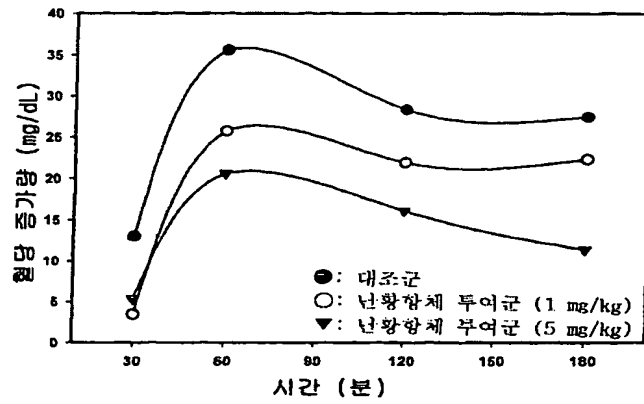
도면 5



도면 6



도면 7



도면 8

